

DISCRIMINATION OF HLA-A ALLELE TYPE**Publication number:** JP11216000**Publication date:** 1999-08-10**Inventor:** MORIBE TOYOTERU; KANESHIGE TOSHIHIKO**Applicant:** SHIONOGI & CO**Classification:**

- **International:** G01N27/447; C12N15/09; C12Q1/68; C12N15/09;
G01N27/447; C12N15/09; C12Q1/68; C12N15/09;
(IPC1-7); C12N15/09; C12Q1/68; G01N27/447

- **European:**

Application number: JP19980305892 19981027**Priority number(s):** JP19980305892 19981027; JP19970297145 19971029**Report a data error here****Abstract of JP11216000**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method enabling classification (allele typing), at genetic level, of A-antigen subtypes whose discriminative classification has been impossible by conventional means, through resolving problems on assaying HLA-A locus antigen typing by conventional serological method, and to provide a kit or reagent therefor. **SOLUTION:** This method is a combination of A'-method with B-method. The A'-method is as follows: using a pair of primers specific to the base sequence of at least one specific HLA-A allele, and also using a set of pairs of primers corresponding to the respective groups each specific to a base sequence common to respective genes in at least one specific group consisting of a specific HLA-A allele group, PCR is performed, and a product afforded by selective amplification is developed by electrophoresis and detected; and the B-method is as follows: the amplified product of the HLA-A allele group in each specific group is treated with a restriction enzyme affording specific breakage site(s) or a restriction enzyme affording no breakage site at all, and the resulting product is then developed by electrophoresis and detected.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

Family list1 family member for: **JP11216000**

Derived from 1 application

[Back to JP1121](#)**1 DISCRIMINATION OF HLA-A ALLELE TYPE****Inventor:** MORIBE TOYOTERU; KANESHIGE

TOSHIHIKO

EC:**Applicant:** SHIONOGI & CO**IPC:** G01N27/447; C12N15/09; C12Q1/68 (+8)**Publication info:** **JP11216000 A** - 1999-08-10Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-216000

(43)公開日 平成11年(1999)8月10日

(51)Int.Cl.⁵
C 12 Q 1/68
G 01 N 27/447
// C 12 N 15/09

識別記号
ZNA

F I
C 12 Q 1/68
G 01 N 27/26
C 12 N 15/00

Z N A A
3 1 5 Z
A

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 21 頁)

(21)出願番号 特願平10-305892
(22)出願日 平成10年(1998)10月27日
(31)優先権主張番号 特願平9-287145
(32)優先日 平9(1997)10月29日
(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000001926
塙野義製薬株式会社
大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
(72)発明者 森部 竜輝
大阪府高槻市西真上1-2-13-402
(73)発明者 兼富 俊彦
大阪府茨木市天王2-5、J-1105
(74)代理人 弁理士 山内 秀晃

(54)【発明の名称】 HLA-A対立遺伝子型の判別方法

(57)【要約】

【課題】HLA-A対立遺伝子型の判別方法、およびキット、試薬を提供する。

【解決手段】少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子の塩基配列に特異的なプライマー対を用いて、および特定のHLA-A対立遺伝子群からなる少なくとも1つの特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的な各グループに対応するプライマー対のセットを用いてPCR法を行い、選択的増幅より得られた産物を電気泳動により展開し検出す方法(A'法)および各特定のグループ内のHLA-A対立遺伝子群の増幅産物を、特異的な切断部位を与える制限酵素または全く切断部位を与えない制限酵素により処理しそれを電気泳動により展開し検出す方法(B法)を組み合わせて行う。

【特許請求の範囲】

【請求項1】以下のA法およびB法を組み合わせて行う、HLA-A対立遺伝子型の判別方法：

A法：

(1) 特定のHLA-A対立遺伝子群からなる少なくとも1つの特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的な各グループに対応するプライマー対のセットを用いてPCR法を行い、各特定のグループ内のHLA-A対立遺伝子群をグループとして選択的に増幅する、

(2) 前記PCR法により得られた増幅産物を電気泳動により展開し、特定のサイズの増幅されたDNAバンドの存在の有無を確認することにより、各特定のグループ内のHLA-A対立遺伝子群の特定の型をグループとして判別する。

B法：HLA-A対立遺伝子群の特定の型がグループとして判別された場合に、RFLP法、PCR-RFLP法、SSOP法、PCR-SSOP法、PCR-SS法またはPCR-SSCP法をさらに行う。

【請求項2】以下のA'法およびB'法を組み合わせて行う、HLA-A対立遺伝子型の判別方法：

A'法：

(1) 少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子の塩基配列に特異的なプライマー対を用いて、および特定のHLA-A対立遺伝子群からなる少なくとも1つの特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的な各グループに対応するプライマー対のセットを用いてPCR法を行い、各特定のHLA-A対立遺伝子および各特定のグループ内のHLA-A対立遺伝子群をグループとして選択的に増幅する、(2) 前記PCR法により得られた増幅産物を電気泳動により展開し、特定のサイズの増幅されたDNAバンドの存在の有無を確認することにより、対応する各特定のHLA-A対立遺伝子の型および/または各特定のグループ内のHLA-A対立遺伝子群の特定の型をグループとして判別する。

B法：HLA-A対立遺伝子群の特定の型がグループとして判別された場合に、RFLP法、PCR-RFLP法、SSOP法、PCR-SSOP法、PCR-SS法またはPCR-SSCP法をさらに行う。

【請求項3】請求項1または2におけるB法として、以下の(1)および(2)の工程を行う、請求項1または2に記載の方法：

(1) 各特定のグループ内のHLA-A対立遺伝子群の増幅産物を、特異的な切断部位を与える制限酵素または全く切断部位を与えない制限酵素により処理する。

(2) 前記制限酵素により処理した増幅産物を電気泳動により展開し、制限酵素切断の存在の有無を反映するDNA断片サイズを判定し、既知のHLA-A対立遺伝子型のDNA断片サイズを記載した判定表に照らして該HLA-A対立遺伝子群の各型を判別する。

【請求項4】さらにRFLP法、PCR-RFLP

法、SSOP法、PCR-SSOP法、PCR-SSP法およびPCR-SSCP法から選ばれる1または2の方法を行う、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子の塩基配列に特異的なプライマー対が、A1-67A

(配列番号13)とA2-234C(配列番号4)、A1-67T

(配列番号14)とA2-234C(配列番号4)、A2-87G

(配列番号15)とA2-234C(配列番号4)、A2-87A

(配列番号16)とA2-234C(配列番号4)、A2-226A

(配列番号17)とA3-68G(配列番号23)、A2-226C

(配列番号18)とA3-68G(配列番号23)、A2-5T

(配列番号2)とA2-197A(配列番号19)、A2-5T(配列番号2)とA2-197T(配列番号20)、A3-25A(配列番号21)とA3-273T(配列番号10)、A3-25G(配列番号22)とA3-273T(配列番号10)、A3-159A(配列番号24)とA3-273T(配列番号10)、A3-159C(配列番号25)とA3-273T(配列番号10)、A4-8C(配列番号11)とA4-224G(配列番号26)、A4-8C(配列番号11)とA4-224T(配列番号27)、A2-29A(配列番号28)とA2-197A(配列番号19)、A2-29A(配列番号28)とA2-197T(配列番号20)、A2-29T(配列番号29)とA2-234C(配列番号4)、A2-81C(配列番号3)とA2-229C(配列番号30)、A3-71G(配列番号31)とA3-240G(配列番号32)から選ばれるものであり、また特定のHLA-A対立遺伝子群からなる少なくとも1つの特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的な各グループに対応するプライマー対が、A2-5C(配列番号1)とA2-234C(配列番号4)、A2-5T(配列番号2)とA2-234C(配列番号4)、A2-81C(配列番号3)とA2-238A(配列番号5)、A3-12A(配列番号6)とA3-273T(配列番号10)、A3-12G(配列番号7)とA3-273T(配列番号10)、A3-25T(配列番号8)とA3-273T(配列番号10)、A3-59G(配列番号9)とA3-273T(配列番号10)、A4-8C(配列番号1)とA4-254G(配列番号12)から選ばれるものである、請求項1から4のいずれかに記載のHLA-A対立遺伝子型の判別方法。

【請求項6】各特定のグループ内のHLA-A対立遺伝子群の増幅産物に特異的な切断部位を与える制限酵素または全く切断部位を与えない制限酵素が、Fok I、Bsr I、Blnf I、Msp I、Sac II、Bst N I、Mnl I、Hae II I、Hgi I、Bsp1286 I、Fnu4H I、TspRI I、Nla III、Nla IV、Avr II、Bsai I、BsaI I、PnaC I、MspAI Iから選ばれるものである、請求項3から5のいずれかに記載のHLA-A対立遺伝子型の判別方法。

【請求項7】A2-5C(配列番号1)、A2-5T(配列番号

2)、A2-81C(配列番号3)、A2-234C(配列番号

4)、A2-238A(配列番号5)、A3-12A(配列番号

6)、A3-12G(配列番号7)、A3-25T(配列番号8)、

A3-59G(配列番号9)、A3-273T(配列番号10)、A4-

8C (配列番号 1) 、A4-254G (配列番号 1 2) 、A1-67 A (配列番号 1 3) 、A1-67T (配列番号 1 4) 、A2-87G (配列番号 1 5) 、A2-87A (配列番号 1 6) 、A2-226A (配列番号 1 7) 、A2-226C (配列番号 1 8) 、A2-197 A (配列番号 1 9) 、A2-197T (配列番号 2 0) 、A3-25A (配列番号 2 1) 、A3-25G (配列番号 2 2) 、A3-68G (配列番号 2 3) 、A3-159A (配列番号 2 4) 、A3-159C (配列番号 2 5) 、A4-224G (配列番号 2 6) 、A4-224T (配列番号 2 7) 、A2-29A (配列番号 2 8) 、A2-29T (配列番号 2 9) 、A2-229C (配列番号 3 0) 、A3-71G (配列番号 3 1) 、A3-240G (配列番号 3 2) から選ばれる、HLA-A-A 遺伝子タイプに使用するためのプライマー。

【請求項 8】 請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法に使用するための、HLA-A 対立遺伝子型の判別のためのキット。

【請求項 9】 請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法に使用するための、HLA-A 対立遺伝子型の判別のための試薬。

【請求項 10】 請求項 7 記載のプライマーを含む、HLA-A 対立遺伝子型の判別のためのキット。

【請求項 11】 請求項 7 記載のプライマーを含む、HLA-A 対立遺伝子型の判別のための試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 ヒトの主要組織適合抗原である HLA (Human Leukocyte Antigen) は、免疫担当細胞の膜表面に発現し、抗原処理 (antigen processing) された外因性および内因性抗原由來のペプチドを T リンパ球に提示すると共に、自己・非自己の識別マークとして機能している。本発明は、HLA-A-A 対立遺伝子型の判別方法、その試薬およびキットに関するものであり、特に臨床医学領域の臓器移植の際のドナー・レシピエント間の適合性の判定や各種疾患との相関性解析などにおいて有用である。

【0002】

【従来の技術】 HLA 抗原は、従来より、主にヒト同種抗体を用いた血清学的方法により、型判別が行われてきた。すなわち臍帯血や頻回輸血者の血清中に含まれる各 HLA 抗原型に対する特異抗体を用いて抗原抗体反応を行い、補体依存性の細胞障害を惹起させることで、陽性細胞は細胞膜の透過性に変化を来しエオジン色素などの取り込みにより、顯微鏡下で着色され膨化した形態として識別できる。この方法により、HLA クラス I 抗原である HLA-A、B、C 抗原および同クラス I 抗原である D R 、D Q 抗原の型を識別することができる。これらの方法は特異抗体の採取と品質維持、および供給面に問題があった。また方法論的には細胞の生存を指標として判定するため、被検試料の状態の悪化、例えは疾患や採血後の経時的影響に起因する細胞生存率の低

下などが検査成績の信頼性の低下の要因になるという問題があった。

【0003】 近年分子生物学的技術の発展により、HLA 抗原をコードする遺伝子領域の解析に伴い各種の HLA 抗原型と遺伝子の塩基配列の対応性について知られるようになった。すなわち HLA 遺伝子の特定の遺伝子配列を調べることで、被検試料の HLA 抗原型を決定する (遺伝子タイプ) ことが可能となった。特に微細な塩基配列の変化を高感度に検出可能な技術である PCR (Polymerase Chain Reaction) 法は HLA クラス I I 抗原遺伝子である、D R 、D Q 、D P 遺伝子のタイプに利用されている。これらの PCR 法を基盤とした HLA クラス I I 遺伝子タイプの技法として、PCR-S S O P (Sequence-Specific Oligonucleotide Probe) 法、PCR-R F L P (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法、PCR-S S P P (Sequence-Specific Primer) 法、PCR-S S C P (Single Strand Conformation Polymorphism) 法などが開発されている。これらの技法は何れも解析の対象となる遺伝子領域を PCR 法で增幅し、その增幅産物を必要に応じてさらに別の技法を用いることにより、塩基配列の可変部位を解析して、遺伝子型を判別するものである。この HLA クラス I I 遺伝子タイプでは、従来のヒト同種血清を用いた血清学的方法による型分類に留まらず、遺伝子レベルの型分類を可能としている。すなわち、従来の血清学的方法では同一と考えられていた抗原が、遺伝子配列の違いによりさりに細分化され、本検査の臨床的意義の拡大をもたらしている。

【0004】 HLA クラス I I 遺伝子タイプに比べ、PCR 法を利用したクラス I 遺伝子タイプの実用化は著しく遅れている。これは、(1) クラス I 遺伝子では、抗原特異性を反映したものを含め遺伝子変異 (遺伝子置換) の多くが第 2 エクソン (exon) に集中しているのにに対し、クラス I 遺伝子では第 2 ~ 3 エクソン、また一部は第 4 エクソンに散在している。(2) 非古典的遺伝子 (HLA-E, F, G) や疑偽遺伝子 (HLA-H, J, K, L) を含む HLA クラス I 遺伝子間の相同性が高い、などが理由である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、従来の血清学的方法による HLA-A-A ローカス抗原タイプの測定上の問題を解決し、従来法では識別分類が不可能であった A 抗原のサブタイプを遺伝子レベルで分類 (アリルタイプ) 可能にする方法およびそれに用いるキットや試薬を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者は上記の課題に鑑み、銳意研究した結果、染色体 DNA 中に存在する少なくとも 1 つ以上の特定の HLA-A-A 対立遺伝子の塩基配列に特異的な PCR 増幅用プライマー、または特定の H

L A - A 対立遺伝子群からなる少なくとも 1 つの特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的な各グループに対応する PCR 増幅用プライマーを、創意工夫して設定することができた。さらに H L A - A 対立遺伝子の特定グループ由来の PCR 増幅産物に対しては、各グループ毎に必要に応じた一連の制限酵素の処理により得られる DNA 断片サイズから、1種類の対立遺伝子を判別することが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち本発明は以下の A 法および B 法を組み合わせて行う H L A - A 対立遺伝子型の判別方法を主旨としたものである。

A 法：

- (1) 特定の H L A - A 対立遺伝子群からなる少なくとも 1 つの特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的な各グループに対応するプライマー対のセットを用いて PCR 法を行い、各特定のグループ内の H L A - A 対立遺伝子群をグループとして選択的に増幅する、
- (2) 前記 PCR 法により得られた増幅産物を電気泳動により展開し、特定のサイズの増幅された DNA バンドの存在の有無を確認することにより、各特定のグループ内の H L A - A 対立遺伝子群の特定の型をグループとして判別する。

B 法： H L A - A 対立遺伝子群の特定の型がグループとして判別された場合に、RFLP 法、PCR-RFLP 法、SSOP 法、PCR-SSOP 法、PCR-SS 法または PCR-SSCP 法をさらに行う。

【0008】ここで上記特定のグループは特定の H L A - A 対立遺伝子群からなる。例えば本発明の 1 の様態として、以下の遺伝子群からなる A3-1 グループ、A3-2 グループ、A3-3 グループ、A3-4 グループを例示することができる。すなわち、A3-1 グループは A*0201 ~ A*0221、A*6901 の遺伝子群からなり、A3-3 グループは A*0217、A*23 01、A*2402 ~ A*2408、A*2410、A*2413、A*2414 の遺伝子群からなり、A3-4 グループは A*0202、A*0205、A*0208、A*214 の遺伝子群からなり、A3-1 グループはその他の遺伝子群からなる。ここで各グループに対応する PCR プライマーは、これら複数のグループのうちの特定のグループを増幅するために、該特定のグループに含まれる全ての各遺伝子に共通な塩基配列に特異的であるように設定する。例えば、A3-1 グループでは A3-12A であり、A3-2 グループでは A3-12G であり、A3-3 グループでは A3-25T であり、A3-4 グループでは A3-59G である。該特定のグループを選択的に増幅する場合、各グループに対応するプライマー対としてセンス (Sense) 、アンチセンス (Antisense) の両方に必ずしもあるグループに特異的前記で設定するプライマーを用いる必要はなく、一方にあるグループに特異的なプライマーを用い、もう一方に全てのグループに特異的なプライマー、例えば A3-27T を用いてよい。

【0009】さらに本発明は以下の A' 法および B' 法を組み合わせて行う H L A - A 対立遺伝子型の判別方法を主旨としたものである。

A' 法：

- (1) 少なくとも 1 つの特定の H L A - A 対立遺伝子の塩基配列に特異的なプライマー対を用いて、および特定の H L A - A 対立遺伝子群からなる少なくとも 1 つの特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的な各グループに対応するプライマー対のセットを用いて PCR 法を行い、各特定の H L A - A 対立遺伝子および各特定のグループ内の H L A - A 対立遺伝子群をグループとして選択的に増幅する、(2) 前記 PCR 法により得られた増幅産物を電気泳動により展開し、特定のサイズの増幅された DNA バンドの存在の有無を確認することにより、対応する各特定の H L A - A 対立遺伝子の型および/または各特定のグループ内の H L A - A 対立遺伝子群の特定の型をグループとして判別する。

B' 法： H L A - A 対立遺伝子群の特定の型がグループとして判別された場合に、RFLP 法、PCR-RFLP 法、SSOP 法、PCR-SSOP 法、PCR-SS 法または PCR-SSCP 法をさらに行う。

【0010】本発明の判別方法は、白血球等の被検試料より得られる染色体 (ゲノム) DNA に対して行う。本発明の判別方法における A' 法は 2 つに分類することができ、1 つは少なくとも 1 つの特定の H L A - A 対立遺伝子の塩基配列に特異的なプライマー対を用いて PCR 法を行い、各特定の H L A - A 対立遺伝子を選択的に増幅する工程、および他の 1 つは特定の H L A - A 対立遺伝子群からなる少なくとも 1 つの特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的な各グループに対応するプライマー対のセットを用いて PCR 法を行い、各特定のグループ内の H L A - A 対立遺伝子群をグループとして選択的に増幅する工程である。前者の工程では以後、増幅産物の電気泳動を行い、特定の DNA バンドを確認することで各特定の H L A - A 対立遺伝子の型が判別できる。後者の工程では同じく増幅産物の電気泳動を行なうが、ここでは各特定のグループ内の H L A - A 対立遺伝子群の特定の型がグループとして判別されるのみであり、この段階では各グループ内の H L A - A 対立遺伝子それぞれの型は判別できない。従って後者の場合は、本発明方法における B' 法を以後適用する。

【0011】上記 A 法若しくは A' 法における DNA バンドの確認は、例えばゲル電気泳動後の真紅エチジウム染色の紫外線照射などにより行う。この A 法若しくは A' 法では 1 植体について、1 または 2 のバンドが確認されるが、それは各被検試料が H L A - A 対立遺伝子の特定の型をホモ接合体またはヘテロ接合体で保有するからである。

【0012】B 法では H L A - A 対立遺伝子群の特定の型がグループとして判別された場合に、RFLP 法、P

PCR-RFLP法、SSOP法、PCR-SSOP法、PCR-SSP法またはPCR-SSCP法をさらに行う。

【0013】本発明は1つの態様として、上記A法若しくはA'法を行った後に、以下のB法を適用する方法を提供する。すなわちRFLP法として、以下の(1)および(2)の工程を行う。

(1) 各特定のグループ内のHLA-A対立遺伝子群の増幅産物を、特異的な切断部位を与える制限酵素により処理する。

(2) 前記制限酵素により処理した増幅産物を電気泳動により展開し、制限酵素切断の存在の有無を反映するDNA断片サイズを判別し、既知のHLA-A対立遺伝子型のDNA断片サイズを記載した判定表に照らして該HLA-A対立遺伝子群の各型を判別する。ここで前記判定表は、あらかじめHLA-A対立遺伝子型が既知である試料の増幅産物を前記制限酵素により処理し、得られたDNA断片サイズを整理・記載して作成する。当業者ならば、このような判定表は容易に作成できる。

【0014】ここに、判定表としては例えば図1～3を参考にすればよい。本明細書にて使用している制限酵素以外の制限酵素を使用する場合には別の判定表を使用すればよい。説明の判定表は、HLA-A対立遺伝子型が既知の試料の増幅産物を新たな制限酵素により処理し、得られたDNA断片サイズから作成すればよい。当業者ならば、このような判定表は作成できる。またこのB法においても、各被検試料がHLA-A対立遺伝子の特定の型をホモ接合体またはヘテロ接合体で保有することに留意する。

【0015】なお上記A法、A'法およびB法において、増幅産物は電気泳動により展開しているが、一般的にはポリアクリルアミドゲル電気泳動、アガロースゲル電気泳動、キャビラリー電気泳動などのゲル電気泳動の技法が利用される。

【0016】上記以外にもB法として、各特定のグループ内のHLA-A対立遺伝子群の増幅産物をナイロンやニトロセルロースなどの膜にプロッティングし、HLA-A対立遺伝子の多型性を示す領域に相補的なオリゴヌクレオチドプローブを膜面に対してハイブリダイズさせることにより該HLA-A対立遺伝子群の各型を判別するSSOP法が挙げられる。なお前記SSOP法はその変法である逆ドットプロット(reverse dot blot)法も含むものである。またB法として、HLA-A対立遺伝子群の特定の型がグループとして判別された後に被検試料より得られる染色体DNA若しくは前記増幅産物に対してさらにPCR法を行い、その増幅産物を必要に応じてさらに別々の技法を用いて解析するPCR-RFLP法、PCR-SSOP法、PCR-SSP法またはPCR-SSCP法なども挙げることができる。これらの方は多くの成書に記載されているので、それらに従って

行うことができる。

【0017】本発明は前記方法に、さらにRFLP法、PCR-RFLP法、SSOP法、PCR-SSOP法、PCR-SSP法またはPCR-SSCP法から選ばれる1または2の方法を行うことによって、HLA-A対立遺伝子を判別することも含む。例えばPCR-SSP法として、少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子の塩基配列に特異的なプライマー対を用いてPCR法を行い、各特定のHLA-A対立遺伝子を選択的に増幅する。

【0018】本発明のA法若しくはA'法における、少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子の塩基配列に特異的なプライマー対としては、A1-67A(配列番号1)とA2-234C(配列番号4)、A1-67T(配列番号1)とA2-234C(配列番号4)、A2-87G(配列番号1)とA2-234C(配列番号4)、A2-87A(配列番号1)とA2-234C(配列番号4)、A2-226A(配列番号1)とA3-68J(配列番号23)、A2-226C(配列番号1)とA3-68J(配列番号23)、A2-5T(配列番号2)とA2-197A(配列番号19)、A2-5T(配列番号2)とA2-197T(配列番号20)、A3-25A(配列番号21)とA3-273T(配列番号10)、A3-25G(配列番号22)とA3-273T(配列番号10)、A3-159A(配列番号24)とA3-273T(配列番号10)、A3-159C(配列番号25)とA3-273T(配列番号10)、A4-8C(配列番号11)とA4-224G(配列番号26)、A4-8C(配列番号11)とA4-224T(配列番号27)、A2-29A(配列番号28)とA2-197A(配列番号19)、A2-29A(配列番号28)とA2-197T(配列番号20)、A2-29J(配列番号29)とA2-234C(配列番号4)、A2-81C(配列番号3)とA2-229C(配列番号30)、A3-71L(配列番号31)とA3-240G(配列番号32)から選ぶことができる、また特定のHLA-A対立遺伝子群からなる少なくとも1つの特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的な各グループに対応するプライマーとしては、A2-5C(配列番号1)とA2-234C(配列番号4)、A2-5T(配列番号2)とA2-234C(配列番号4)、A2-81C(配列番号3)とA2-238A(配列番号5)、A3-12A(配列番号6)とA3-273T(配列番号10)、A3-12G(配列番号7)とA3-273T(配列番号10)、A3-25T(配列番号8)とA3-273T(配列番号10)、A3-59J(配列番号9)とA3-273T(配列番号10)、A4-8C(配列番号11)とA4-254G(配列番号12)から選ぶことができる。これらのプライマー対およびそのPCR増幅産物のDNA断片サイズを記載した表図4に示す。なお本発明は、上記HLA-A対立遺伝子タイプングに使用するための、少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子の塩基配列に特異的なプライマー、または特定のHLA-A対立遺伝子群からなる少なくとも1つの特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的な各グループに対応するプライマ

—(配列番号1～配列番号32)自身も含むものである。

【0019】またB法における、各特定のグループ内のHLA-A対立遺伝子群の増幅産物に特異的な切断部位を与える制限酵素または全く切断部位を与えない制限酵素は、Pok I、Bsr I、Hinf I、Msp I、Sac II、Bst NI、Mnl I、Hae III、Hga I、BspI289 I、EcoRI I、TspRI I、Nla III、Nla IV、Ava II、BsaJ I、BsaH I、PmeI I、MspAI Iから選ぶことができる。

【0020】HLA-A対立遺伝子は新規なもののが次々と発見され、WHO(世界保健機構)のHLA命名委員会の報告書では1997年3月時点で82種類の対立遺伝子の存在が知られている。本発明はこれらの全ての対立遺伝子を識別することができるが、今後さらに発見・登録される対立遺伝子の識別についても本発明で示した方法若しくはそれに対する上記以外のプライマーや制限酵素の追加などの容易な変更により、対応することは可能である。

【0021】また本発明は、本明細書記載のHLA-A対立遺伝子型の判別方法に使用するためのキット、試薬も提供することが可能である。さらに本発明は、本明細書記載のプライマーを含むキット、試薬も提供することが可能である。該キットは、例えば本発明で開示されているプライマー(配列番号1～配列番号32)を含む溶液、PCR緩衝液(濃縮溶液でもよい)、耐熱性DNAポリメラーゼおよび該キットの説明書(上記判定表を含む)により構成される。前記プライマーは、プライマーワークスは、プライマーセットの形で構成されていてよく、該プライマーを含む溶液は凍結乾燥状態でもよい。B法にRFLP法を適用する場合、必要に応じて本発明で開示されている制限酵素およびその制限酵素切断用緩

衝液を構成に加えてもよい。またB法にSSOP法を適用する場合、適当なオリゴヌクレオチドフローブ(標識していても標識していないてもよい)、変性液、ハイブリダイゼーション緩衝液、洗浄液および発色試薬(非標識の場合)などを構成に加えてもよい。さらにゲノムDNAを単離するためのグアニシンチオシアネットバッファーなど、キットの構成は本発明の実施を促進する程度で任意に追加することができる。

【0022】本発明の実用法の手順の1としては、表1に示したプライマーワークスの内、第2エクソンについてはA2-5CとA2-23A(A2-1グループ)、A2-5TとA2-234C(A2-2グループ)、A2-81CとA2-238A(A2-3グループ)の3組のプライマーワークスのセト、第3エクソンについてはA3-12AとA3-273T(A3-1グループ)、A3-12GとA3-273T(A3-2グループ)、A3-25TとA3-273T(A3-3グループ)、A3-59GとA3-273T(A3-4グループ)の4組のプライマーワークスのセト、第4エクソンについてはA4-8CとA4-254G(A4-1グループ)のプライマーワークスを用いて、被検DNA試料よりPCR増幅を行い、増幅したグループを特定する。このとき1反応チューブに1プライマーワークスを用いて増幅を行えばよい。次にそのグループ内の対立遺伝子を区別可能な一連の制限酵素による処理を行い、DNA断片サイズを判断し、判定表のサイズを参考にして、A対立遺伝子を特定する。なお、以上の操作で、1つの被検試料から2種類以下のA対立遺伝子が特定できない場合には、必要に応じて特定のA対立遺伝子またはA対立遺伝子群の特定のグループに特異的なプライマーワークスによりPCR法を施行し、増幅の有無を元にして特定する。

【0023】

【表1】

H L A - A 遺伝子タイピングに使用するプライマー

名称	塩基配列	配列番号
A2-5C	5'-SCTCGTCCCCAGGGCTCC-3'	1
A2-5T	5'-TCCCTCCGTCCCCAGGGCTCT-3'	2
A2-81C	5'-AGCCCCGCTTCATGCC-3'	3
A2-234C	5'-TAGCCCCGGCAGGGTCCC-3'	4
A2-238A	5'-TTGTAGTAGCGGAGCGCGA-3'	5
A3-12A	5'-GGCCAGGTTCTCACACCA-3'	6
A3-12G	5'-GGCCAGGTTCTCACACCG-3'	7
A3-25T	5'-CACACCTCCAGATGATOTT-3'	8
A3-59G	5'-TCCGACTGGCCTTCCTG-3'	9
A3-273T	5'-TGGCCCTTGTTACCCG-3'	10
A4-8C	5'-TCCYGWCAAGACSCCCCC-3'	11
A4-254G	5'-CTCAGGGTGAGGGGCTTG-3'	12
A1-67A	5'-GGCCCTGACCCAGACCA-3'	13
A1-67T	5'-GGCCCTGACCCAGACCT-3'	14
A2-87G	5'-CAGTGGCTACGTGGACG-3'	15
A2-87A	5'-CAGTGGCTACGTGGACA-3'	16
A3-226A	5'-ACTCACAGACTGACCGAGA-3'	17
A3-226C	5'-ACTCACAGACTGACCGAGC-3'	18
A2-19/A	5'-CTGTGASTGGGCCTTCACA-3'	19
A2-19'T	5'-CTGTGASTGGGCCTTCACT-3'	20
A3-25A	5'-ACACGGTCCAGAGGATGTA-3'	21
A3-25G	5'-ACACGGTCCAGAGGATGTG-3'	22
A3-68G	5'-TCGTAACGGTCCCTGCTGG-3'	23
A3-159A	5'-ATGGCGGCTUAGATCACCA-3'	24
A3-159C	5'-TGGCGGGTCAAGATCACCC-3'	25
A4-224G	5'-ATGCTJCACATGGCAGGTG-3'	26
A4-224T	5'-ATGCTGACATGQCAAGGT-3'	27
A2-29A	5'-TCCATGAGGTATTCTACACA-3'	28
A2-29T	5'-TCCATGAGGTATTCTACACT-3'	29
A2-229C	5'-GAGCCCGATCCGAGGC-3'	30
A3-71G	5'-TCTCCCGGGTACCAAG-3'	31
A3-240G	5'-CTTCCCGTTCTCCAGGTG-3'	32

【0024】次に、前記本発明の実用法の手順の1つをさらに詳細に説明する。

【0025】以下にゲノムDNAの調製方法の一例を説明する。採取した血液より常法に従い白血球を分離し、これにブリニジンチオシアネートバッファーなどを加えて溶解させた後、フェノール抽出によりタンパク質を除去する。これに酢酸ナトリウム(pH 5.2)を添加し搅拌後、冷エタノールを添加してゲノムDNAを得る。このDNAを用いて、以下のようにしてHLA-A遺伝子の型判定を行う。

【0026】先ず、前記DNAを用いて上記表1に示したようなプライマーを用いたPCR法によりHLA-A遺伝子の第2、3、4エクソン領域の増幅を行う。

【0027】例えば、第2エクソンについてはA2-5CとA2-234C(A2-1グループ)、A2-5TとA2-238A(A2-2グループ)、A2-81CとA2-238A(A2-3グループ)の組のプライマーのセットを用いる。増幅反応に用いる試薬は市販のものを使用することができ、添付の説明書の指示に従って行えばよいが、必要に応じ反応温度、時間、サイクル数などの条件を変てもよい。増幅産物は常法に從

い、10%程度のポリアクリラミドゲルで電気泳動後、エチジウムプロマイド染色してグループ特異的に増幅したバンドを検出することができる。また、ゲルはアガロースなども用いることができ、ゲル濃度は必要に応じ変えててもよい。

【0028】例えば、第3エクソンについてはA3-12AとA3-ZT3T (A3-1グループ)、A3-12GとA3-ZT3T (A3-2グループ)、A3-25TとA2-ZT3T (A3-3グループ)、A3-59GとA3-273T (A3-4グループ)の4組のプライマー対のセットを用いる。以下第2エクソンと同様の工程で、PCR法によるDNA増幅を行い、電気泳動により増幅産物 (グループ特異的に増幅したバンド) を検出する。

【0029】例えば、第4エクソンについてはM-8CとA4-254G (M-1グループ) のプライマー対 (セット) を用いる。以下第2、3エクソンの検出と同様の工程で、DNA増幅、増幅産物 (グループ特異的に増幅したバンド) の検出を行う。

【0030】次に、グループとして判別された遺伝子群に対してはPCR増幅産物をそれぞれのグループに特異的な制限酵素を用いて切断する。例えば、あるグループはFok I、Bsr I、Hinf I、Msp I、Sac II、Bst N I、あるグループはPok I、Hinf I、Msp I、あるグループはBsr I、Bst N I、Mnl I、あるグループはFok I、Msp I、Mnl I、Hae III、Hga I、あるグループはFok I、Bsr I、Bsp1286 I、FnuM I、あるグループはBsp1286 I、Fn u4H I、あるグループはTsp R I、あるグループはPst IあるいはBst N Iで切断する。また、必要に応じてNla II I、Nla IV、Ava II、Bsa J I、Mnl I、Bsa H I、Pma C I、Msp A I、Tsp R I、Bsp1286 I、Bst Iのうちから制限酵素を選択し、補助的な切削を行う。切断した増幅産物は常法に従い、10%程度のポリアクリラミドゲルで電気泳動後、エチジウムプロマイド染色してバンドを検出し、そのRFLPバンドパターンからHLA-A遺伝子型を判定する。また記録、ゲルはアガロースなども用いることができ、ゲル濃度は必要に応じ変えてでもよい。なお、制限酵素は市販のものを使うことができ、添付の説明書の指示に従って切削反応を行なえばよい。

【0031】PCR-RFLP法によって判別できないアリルの組み合わせ、例えば、A=0201=0207=0215N=0220、A=0205=0208、A=0206=0221、A=0207=0215N、A=2402=2405、A=2601=2605、A=7401=7402については、表1に示したシーケンス特異のプライマーの対、A3-25AとA3-273T (A=0201特異的)、A3-25GとA-273T (A=0207特異的)、A2-5TとA2-197T (A=0201、A=0205特異的)、A2-197A (A=0208、A=0202特異的)、A2-8TとA2-234C (A=0206特異的)、A2-8TとA2-234C (A=0221特異的)、A4-8CとA4-224G (A=0207特異的)、A4-8CとM-224T (A=0215N特異的)、A3-159AとA3-273T (A=2402特異的)、A3-159CとA3-273T (A=2405特異的)、A2-226CとA

3-68G (A=2601特異的)、A2-226AとA3-68G (A=2605特異的)、A1-67AとA2-234C (A=7401特異的)、A1-67TとA2-234C (A=7402特異的) を用いてPCR-SSP解析を行い判別する。これらは、PCR増幅の有無によってHLA-A-A遺伝子型を判定する。このとき1反応チューブに1プライマー対を用いて増幅を行うか、該反応チューブに複数のプライマー対を入れて増幅させてもよい。実際の検査・キットでは、例えばA=02アリル関連の3種類のPCR-SSP解析、すなわちA=0201=0207、A=0201=0220、A=0207=0215N用のPCR-SSP反応を1チューブで行い、操作タスクや経費の削減を実現することができる。

【0032】また、PCR-RFLPとPCR-SSP解析によって判別できないハテロ接合体の組み合わせ、例えば、A=0201/0208=0205/0220、A=0201/0205=0202/0206、A=2402/2502=2407/2501、A=6602/6803=6603/68012については、表1に示したプライマーの対、A2-29AとA2-19TA (A=0220特異的)、A2-29AとA2-197T (A=0201、A=0202特異的)、A2-81CとA2-229C (A=2501、A=2502特異的)、A2-29TとA2-234C (A=68012、A=6803特異的) を用いてDNA増幅を行う。増幅産物は常法に従い、ポリアクリラミド電気泳動またはアガロース電気泳動後、エチジウムプロマイド染色してバンドを検出することができる。

【0033】そしてPCR増幅産物は制限酵素、例えば、Msp IあるいはBsr Iで切断し、前記同様ゲル電気泳動などによりバンドを検出する。そして、そのRFLPバンドパターンからHLA-A遺伝子型を判定する。

【0034】

【実施例】次に、実際の試験試料を用いた実施例によって本発明さらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらのみに限定されるものではない。

【0035】実施例1

1. ダノムDNAの単離

正常人より採取した血液 (約10ml) より常法に従い分離した白血球 (試料1～7) あるいはホモ接合体の培養細胞株 (試料8～10) に500μlのグアニジンチオシアネートバッファー (4Mグアニジンチオシアネート、25mMクエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.5%N-ラウロイルサルコシルナトリウム、1%メルカブトエタノール) を加えて溶解させた後、2回のフェノール抽出によりタンパク質を除去した。これに3M酢酸ナトリウム (pH 5.2) を添加し搅拌後、2倍量の冷エタノールを添加してダノムDNAを得た。このDNAを用いて、以下のようにしてHLA-A-A遺伝子の型判定を行った。

【0036】2. PCR法による選択的增幅

上記DNAを用いて、表1に示したアリルグループ特異的プライマーを用いたPCR法によりHLA-A遺伝子の第2および第3エクソン領域の増幅を行った。

【0037】第2エクソンについてはA=5CとA2-234C

(A2-1グループ)、A2-5TとA2-234C (A2-2グループ)、A2-81CとA2-238A (A2-3グループ)の3組のプライマー対のセットを用いた。反応溶液はゲノムDNAを100ng、あらかじめ等量のTaq StartTMAntibodyと室温で5分間反応させた耐熱性DNAポリメラーゼを1 unit、そして最終濃度がTris-HCl (pH8.3) は10mM、KClは50mM、MgCl₂は1.5mM、TritonX-100は0.1%、dNTPsは200μM、プライマー対は0.2μMや2μMになるように添加した組成液で、全量を50μlとして反応を行った。PCR増幅装置はGeneAmp PCR system 9600を用いた。DNA増幅は変性(94°C)を2分行った後、変性30秒、アニーリング(62或いは67°C)45秒、DNA伸長(72°C)30秒の反応を33サイクル繰り返すことにより行った。増幅産物は常法に従い、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、エチジウムプロマイド染色してグループ特異的に増幅したバンドを検出した。

【0038】図5に示したように試料6、8、9ではA2-1グループ特異的な増幅が認められ、試料1、2、10ではA2-2グループ特異的な増幅が認められた。また、試料3、4、5、7、9、10ではA2-3グループ特異的な増幅が認められた。

【0039】第3エキソンについてはA3-12AとA3-273T (A3-1グループ)、A3-12GとA3-273T (A3-2グループ)、A3-25TとA2-273T (A3-3グループ)、A3-59GとA3-273T (A3-4グループ)の4組のプライマー対のセットを用いた。反応溶液は、ゲノムDNAを100ng、あらかじめ等量のTaq StartTMAntibodyと室温で5分間反応させた耐熱性DNAポリメラーゼを1 unit、そして最終濃度がTris-HCl (pH8.3) は10mM、KClは50mM、MgCl₂は1.5mM、TritonX-100は0.1%、dNTPsは200μM、プライマー対は0.2μMや2μMになるように添加した組成液で、全量を50μlとして反応を行った。以下第2エキソンと同様に、PCR増幅装置はGeneAmp PCR system 9600を用い、DNA増幅は変性(94°C)を2分行った後、変性30秒、アニーリング(62或いは67°C)45秒、DNA伸長(72°C)30秒の反応を33サイクル繰り返すことにより行った。増幅産物は10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、エチジウムプロマイド染色してグループ特異的に増幅したバンドを検出した。

【0040】図6に示したように試料5、6、7、8、9ではA3-1グループ特異的な増幅が認められ、試料1、2ではA3-2グループ特異的な増幅が認められた。また、試料3、4、9、10ではA3-3グループ特異的な増幅が認められ、試料10ではA3-4グループ特異的な増幅が認められた。

【0041】3. 増幅産物の制限酵素処理

第2および第3エキソンに対するPCR増幅産物はそれぞれのグループに特異的な制限酵素を用いて切断した。すなわち、A2-1グループはFok I、Bsr I、HinfI、Msp I、Sac II、Bst N I、A2-2グループはFok I、Hinf I、

Msp I、A2-3グループはBsr I、Bst N I、Mnl I、A3-1グループはFok I、Msp I、Mnl I、Hae III、Hga I、A3-2グループはFok I、Bsr I、BspI286 I、Pmlf4H I、A3-3グループはBspI286 I、Pmlf4H I、A3-4グループはTspRI Iで切断した。また、必要に応じてNla III、Mla IV、Ava I I、BsaI I、Mnl I、BsaH I、Pmlf C I、MspA I、Tspf I I、BspI286 I、Bsr Iのうちから制限酵素を選択し、補助的な切削を行った。

【0042】図7-10に試料2、3、6、8の実際のRFLPパターンを示した。試料2ではA2-2とA3-2グループのRFLP解析を行い、試料3ではA2-3とA3-3グループのRFLP解析を行った。また、試料6、8ではA2-1とA3-1グループのRFLP解析を行った。判定表(図1～図3)を用いて、それぞれのRFLPパターンからHLA-A遺伝子の型判定を行った。同様にして他の試料についても判定表を用いてRFLPパターンからHLA-A遺伝子の型判定を行った。

【0043】さらに、試料1については第4エキソンのPCR-RFLP解析、すなわち第4エキソンに対するPCR増幅産物はPst IあるいはBst N Iで切断した。

【0044】4. PCR-SSPによる解析

試料1、4、9、10については必要に応じたPCR-SSP解析を行った。すなわち、PCR-RFLP法によって判別できないアリルの組み合わせ、A*0201:0207:0215H:0220、A*0205:0208、A*0206:0221、A*0207:0215N:0220、A*2402:2405、A*2601:2605、A*7401:7402については、表1に示したシーケンス特異的プライマーの対、A3-25AとA3-273T (A*0201特異的)、A3-25GとA2-273T (A*0202特異的)、A2-5TとA2-197T (A*0201、A*0205特異的)、A-2-5TとA2-197A (A*0208、A*0220特異的)、A2-87GとA2-234C (A*0206特異的)、A2-87AとA2-234C (A*0221特異的)、A4-8CとA4-224G (A*0207特異的)、A4-8CとA2-47 (A*0215特異的)、A3-159AとA3-273T (A*02402特異的)、A3-159CとA3-273T (A*2405特異的)、A2-226AとA3-68G (A*2601特異的)、A2-226AとA3-68G (A*2605特異的)、A1-67AとA2-234C (A*7401特異的)、A1-67TとA2-234C (A*7402特異的)を用いてPCR-SSP解析により判別を行った。反応液は、ゲノムDNAを100ng、あらかじめ等量のTaq StartTMAntibodyと室温で5分間反応させた耐熱性DNAポリメラーゼを1 unit、そして最終濃度がTris-HCl (pH8.3) は10mM、KClは50mM、MgCl₂は1.5mM、TritonX-100は0.1%、dNTPsは200μM、プライマー対は0.2μMや2μMになるように添加した組成液で、全量を50μlとして反応を行った。DNA増幅はGeneAmp PCR system 9600などのPCR増幅装置を用い、変性(94°C)を2分行った後、変性30秒、アニーリング(62或いは67°C)45秒、DNA伸長(72°C)30秒の反応を33サイクル繰り返すことにより行った。増幅産物は常法に従い、10%程度のポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、エチジウムプロマイド染色してバンドを検出し

た。

【0045】5. ヘテロ接合体の組み合わせの解析
また、PCR-RFLPとPCR-SSP解析によって判別できないヘテロ接合体の組み合わせ、A*0201/0208=0205/0220、A*0201/0205=0202/0206、A*2402/2502=2407/2501、A*6602/6803=6603/68012については、表1に示したプライマーの対、A2-29AとA2-19TA (A*0220特異的)、A2-29AとA2-19TT (A*0201、A*0202特異的)、A2-81CとA2-229A (A*2501、A*2502特異的)、A2-29TとA2-234C (A*68012、A*6803特異的)を用いてDNA増幅を行った。反応溶液は、ゲノムDNAを100ng、あらかじめ等量のTaq StartTMAntibodyと室温で5分間反応させた耐熱性DNAポリメラーゼを1 unit、そして最終濃度がTris-HCl (pH8.3) は10mM、KClは50mM、MgCl₂は1.5mM、Triton X-100は0.1%、dNTPsは200μM、プライマー対は20.2或いは0.4μMになるように添加した組成液で、全量を50μlとして反応を行った。DNA増幅はGeneAmp PCR system 9600などのPCR増幅装置を用いた。変性 (94°C) を2分行った後、変性30秒、アニーリング (59或いは62°C) 45秒、DNA伸長 (72°C) 30秒の反応を33サイクル繰り返すことにより行った。増幅産物は常法に従い、10%程度のポリアクリルアミドゲル電気泳動後、エチジウムプロマイド染色してバンドを検出した。

【0046】そしてPCR増幅産物は制限酵素Msp IあるいはBsr Iで切断した。切断した増幅産物は前記と同様、常法に従い、10%程度のポリアクリルアミドゲル電気泳動後、エチジウムプロマイド染色してバンドを検出し、そのRFLPバンドパターンからHLA-A遺伝子型を判定した。

【0047】このようにして判定されたHLA-A遺伝子型を表2に示す。

【表2】

試料	HLA-A遺伝子型
1	A*0201/0201
2	A*0204/0204
3	A*2301/2301
4	A*2402/2402
5	A*2501/2501
6	A*3101/3101
7	A*3201/3201
8	A*1101/3101
9	A*0301/2402
10	A*0202/2402

【0048】実施例2

正常人より採取した血液(約10ml)より常法に従い分離した白血球に500μlのグアニジンチオシアネートバッファー (4Mグアニジンチオシアネート、25mMクエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.5% N-ラウロイルサルコシンナトリウム、1%メルカプトエタノール)を加えて溶解

させた後、2回のフェノール抽出によりタンパク質を除去した。これに3M酢酸ナトリウム (pH 5.2)を添加し攪拌後、2倍量の冷エタノールを添加してゲノムDNAを得た。

【0049】上記DNAを用いて、表1に示したアリルグループ特異的プライマーを用いたPCR法によりHLA-A遺伝子の第2および第3エクソン領域の増幅を行った。

【0050】第2エクソンについてはA2-5CとA2-234C (A2-1グループ)、A2-5TとA2-234T (A2-2グループ)、A2-81CとA2-238A (A2-3グループ)の3組のプライマー対のセットを用いた。反応溶液はゲノムDNAを100ng、あらかじめ等量のTaq StartTMAntibodyと室温で5分間反応させた耐熱性DNAポリメラーゼを1 unit、そして最終濃度がTris-HCl (pH8.3) は10mM、KClは50mM、MgCl₂は1.5mM、Triton X-100は0.1%、dNTPsは200μM、プライマー対は0.2μM、Taq StartTMAntibodyと室温で5分間反応させた耐熱性DNAポリメラーゼを1 unit、そして最終濃度がTris-HCl (pH8.3) は10mM、KClは50mM、MgCl₂は1.5mM、Triton X-100は0.1%、dNTPsは200μM、プライマー対は0.2μM、Taq StartTMAntibodyと室温で5分間反応させた耐熱性DNAポリメラーゼを1 unit、そして最終濃度がTris-HCl (pH8.3) は10mM、KClは50mM、MgCl₂は1.5mM、Triton X-100は0.1%、dNTPsは200μM、プライマー対は0.2μMになるように添加した組成液で、全量を50μlとして反応を行った。PCR増幅装置はGeneAmp PCR system 9600を用いた。DNA増幅は変性 (94°C) を2分行った後、変性30秒、アニーリング (62或いは67°C) 45秒、DNA伸長 (72°C) 30秒の反応を33サイクル繰り返すことにより行った。増幅産物は常法に従い、10%程度のポリアクリルアミドゲル電気泳動後、エチジウムプロマイド染色した結果、A2-1及びA2-2グループ特異的に増幅したバンドを検出した。

【0051】第3エクソンについてはA3-12AとA3-273T (A3-1グループ)、A3-12TとA3-273T (A3-2グループ)、A3-25TとA2-273T (A3-3グループ)、A3-59GとA3-273T (A3-4グループ)の4組のプライマー対のセットを用いた。反応溶液は、ゲノムDNAを100ng、あらかじめ等量のTaq StartTMAntibodyと室温で5分間反応させた耐熱性DNAポリメラーゼを1 unit、そして最終濃度がTris-HCl (pH8.3) は10mM、KClは50mM、MgCl₂は1.5mM、Triton X-100は0.1%、dNTPsは200μM、プライマー対は0.2μMになるように添加した組成液で、全量を50μlとして反応を行った。以下第2エクソンと同様に、PCR増幅装置はGeneAmp PCR system 9600を用い、DNA増幅は変性 (94°C) を2分行った後、変性30秒、アニーリング (62或いは67°C) 45秒、DNA伸長 (72°C) 30秒の反応を33サイクル繰り返すことにより行った。増幅産物を10%程度のポリアクリルアミドゲル電気泳動後、エチジウムプロマイド染色した結果 A3-1及びA3-2グループ特異的に増幅したバンドを検出した。

【0052】第2および第3エクソンに対するPCR増幅産物はそれぞれのグループに特異的な制限酵素を用いて切断した。すなわち、A2-1グループはFok I、Bsr I、Hinf I、Msp I、Sac II、Bst N I、A2-2グループはFok I、Hinf I、Msp I、A3-1グループはFok I、Msp I、Mnl I、Hae III、Hga I、A3-2グループはFok I、Bsr I、Bsp I、Bpu 11Iで切断した。切断したPCR増幅産物

は10%程度のポリアクリラミドゲル電気泳動後、エチジウムプロマイド染色した。

【0053】A2-1、A2-2、A3-1、A3-2グループのRFLP解析後、判定表(図1～図3)を用いて、それぞれのRFLPパターンからHLA-A遺伝子の型判定を行った。A2-1グループのRFLP解析からはA=1101=1102=1103-1104と判定された。A2-2グループのRFLP解析からはA=0201=0203=0204=0207=0209=0212=0213=0215N=0216=0217=0218=0219=0220と判定された。A3-1グループのRFLP解析からはA=1101=1102=1103と判定された。A3-2グループのRFLP解析からはA=0201=0206=0207=0209=0211=0215N=0220=0221=6901と判定された。さらに、A2-1グループはNaIIVによって補助的に切離することによってA=1101=1102と判定された。これら第2および第3エキソンの判定結果を合せることによって、HLA-A遺伝子型はA=1101とA=0201=0207=0209=0215N=0220と判定された。

【0054】さらに、第2および第3エキソンのRFLP解析によって判別できないアリルの組み合せ、A=0201=0207=0209=0215N=0220については第4エキソンのPCR-R-RFLP解析、すなわち第4エキソンに対するPCR増幅物をPst Iで切離すことによって、A=0201=0207=0215N=0220と判定された。

【0055】上記PCR-RFLP法によって判別できないアリルの組み合せ、A=0201=0207=0215N=0220については、表1に示したシーケンス特異的プライマーの対、A3-25AとA3-273T(A=0201特異的)、A3-25GとA-273T(A=0207特異的)、A2-5TとA2-197A(A=0201、A=0205特異的)、A2-5TとA2-197A(A=0208、A=0202特異的)、A4-8CとA4-224T(A=0207特異的)、A4-8CとM-224T(A=0215N特異的)を用いたPCR-SSP解析により判別を行った。反応液は、ゲノムDNAを100ng、あらかじめ等量のTaq StartTMAntibodyを室温で5分間反応させた耐熱性DNABオリゴリーザーを1unit、そして最終濃度がTris-HCl(pH8.3)は10mM、KClは50mM、MgCl₂は1.5mM、TritonX-100は0.1%、dNTPsは200μM、プライマー一对は0.2μMになるように添加した組成液で、全量を50μlとして反応を行った。PCR増幅装置はGeneAmp PCR system 9600を用い、DNA増幅は実性(94°C)を2分行った後、変性30秒、アニーリング(62°Cないし67°C)45秒、DNA伸長(72°C)30秒の反応を33サイクル繰り返すことにより行った。増幅産物を10%程度のポリアクリルアミドゲル電気泳動後、エチジウムプロマイド染色した結果、図1に示したように試料11ではA=3301、A2-1およびA3-1グループ特異的な増幅が認められ、試料11のHLA-A対立遺伝子の一方はA=3301と判別された。試料12ではA2-1およびA3-1グループ特異的な増幅が認められた。しかし、A=3301特異的な増幅が認められなかったので試料12はA=3301を持たないことが分かった。

【0056】このようにしてHLA-A遺伝子型はA=0201/1101と判別された。

【0057】実施例3

正常人より採取した血液(約10ml)より常法に従い分離した白血球に500μlのグアニジンチオシアネートバッファー(4Mグアニジンチオシアネート、25mMクエン酸ナトリウム(pH 7.0)、0.5%N-ラウロイルサルコシナトリウム、1%メルカブトエタノール)を加えて溶解させた後、2回のフェノール抽出によりタンパク質を除去した。これに3硝酸ナトリウム(pH 5.2)を添加し搅拌後、2倍量の冷エタノールを添加してゲノムDNA(試料11、12)を得た。

【0058】上記DNA試料11、12を用いて、表1に示したHLA-A対立遺伝子A=3301の塩基配列に特異的プライマー(シーケンス特異的プライマー)、およびアリルグループ特異的プライマーを用いてPCR法を行い、HLA-A対立遺伝子A=3301およびHLA-A遺伝子の第2および第3エクソン領域の増幅を行った。

【0059】HLA-A対立遺伝子A=3301塩基配列特異的PCR増幅についてはA3-71GとA3-240Gの1組のプライマー一对を用いた。第2エクソンについてはA2-5CとA2-234C(A2-1グループ)、A2-5TとA2-234C(A2-2グループ)、A2-8ICとA2-238A(A2-3グループ)の3組のプライマー一对のセットを用いた。第3エクソンについてはA3-12AとA3-273T(A3-1グループ)、A3-12GとA3-273T(A3-2グループ)、A3-25TとA2-273T(A3-3グループ)、A3-59GとA3-273T(A3-4グループ)の4組のプライマー一对のセットを用いた。反応液は、ゲノムDNAを100ng、あらかじめ等量のTaq StartTMAntibodyを室温で5分間反応させた耐熱性DNABオリゴリーザーを1unit、そして最終濃度がTris-HCl(pH8.3)は10mM、KClは50mM、MgCl₂は1.5mM、TritonX-100は0.1%、dNTPsは200μM、プライマー一对は0.2μMになるように添加した組成液で、全量を50μlとして反応を行った。PCR増幅装置はGeneAmp PCR system 9600を用い、DNA増幅は実性(94°C)を2分行った後、変性30秒、アニーリング(62°Cないし67°C)45秒、DNA伸長(72°C)30秒の反応を33サイクル繰り返すことにより行った。増幅産物を10%程度のポリアクリルアミドゲル電気泳動後、エチジウムプロマイド染色した結果、図1に示したように試料11ではA=3301、A2-1およびA3-1グループ特異的な増幅が認められ、試料11のHLA-A対立遺伝子の一方はA=3301と判別された。試料12ではA2-1およびA3-1グループ特異的な増幅が認められた。しかし、A=3301特異的な増幅が認められなかったので試料12はA=3301を持たないことが分かった。

【0060】第2および第3エクソンに対するPCR増幅産物はそれぞれのグループに特異的な制限酵素を用いて切離した。すなわち、A2-1グループはFok I、Bsr I、Hinf I、Msp I、Sac II、Bst N I、A3-1グループはFok I、Msp I、Msp I、Hae III、Hga Iで切離した。また、試料11のA3-1グループについてはPaaC Iで補助的な切離を行った。切離したPCR増幅産物は10%程度のポリアクリルアミドゲル電気泳動後、エチジウムプロマイド染

色した。

【0061】図12、13に試料11、12の実際のRFLPパターンを示した。A2-1、A3-1、グループのRFLP解析後、判定表(図1～図3)を用いて、それぞれのRFLPパターンからHLA-A遺伝子の型判定を行った。試料11については、A2-1グループのRFLP解析からA*3301=3303/3401=3402=6601=6602=6801=6901=6902と判定された。またA3-1グループのRFLP解析からA*31012=3301=3303/6602=6603と判定された。これら第2および第3エキソンの判定結果を合せることによってA*3301=3303/6602と判定された。すでにA*3301塩基配列に特異的な増幅が認められているので、試料11のHLA-A遺伝子型はA*3301とA*6602と判定された。試料12についてA2-1グループのRFLP解析からA*3301=3303/31012と判定された。A2-1グループのRFLP解析からA*31012=3301=3303/A*31012=3301=3303と判定された。これら第2および第3エキソンの判定結果を合せることによって、A*31012/3301=3303と判定された。すでにA*3301塩基配列特異的な増幅が認められていないので、試料12のHLA-A遺伝子型はA*31012とA*3303と判定された。

【0062】

【発明の効果】

【0063】本発明によれば、少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子の塩基配列に特異的なプライマー対、および特定のHLA-A対立遺伝子群からなる少ない

くとも1つの特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的な各グループに対応するプライマー対のセットによるPCR増幅と、さらに各特定のグループ内のHLA-A対立遺伝子群の増幅産物の特異的な制限酵素処理(RFLP法)等により、1種類の対立遺伝子を判別することができるるので、従来の血清学的検査によるHLA-Aローカス抗原タイプングの測定上の問題を解決し、従来法では識別分類が不可能であったA抗原のサブタイプを遺伝子レベルで分類(アリルタイプング)することができる。そして本発明はその方法およびそれに用いるキット、試薬を提供するものであり、これらは臨床医学領域の臓器移植の際のドナー・レシピエント間の適合性の判定や各種疾患との相関性解析などにおいて有用となる。

【配表】<11> Shionogi & Co., LTD.

<12> Methods for HLA-A DNA typing

<13> A005941

<15> JP 297145/1997

<151> 1997-10-29

<16> 32

<21> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer A2-5C

<400> 1
SCTCGTCCCC AGGCTCC

17

<210> 2
<211> 18
<212> DNA

<400> 2
TCCTCGTCCC CAGGCTCT

18

<210> 3
<211> 17
<212> DNA

<400> 3
AGCCCCGGCTT CATOGCC

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer A2-81C

17

<210> 4
<211> 17
<212> DNA

<400> 4
TAGCCCGGCCA GGGTCCC

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer A2-234C

17

<210> 5
<211> 19
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer A2-238A

<400> 5	
TITGAGTACG GGAGCGCGA	19
<210> 6	<213> Artificial Sequence
<211> 18	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A3-12A
<400> 6	
GGCCAGGTTC TCACACCA	18
<210> 7	<213> Artificial Sequence
<211> 18	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A3-126
<400> 7	
GGCCAGGTTC TCACACCG	18
<210> 8	<213> Artificial Sequence
<211> 20	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A3-257
<400> 8	
CACACCCCTCC AGATGATGTT	20
<210> 9	<213> Artificial Sequence
<211> 18	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A3-596
<400> 9	
TGGGACTGGC GCTTCCTG	18
<210> 10	<213> Artificial Sequence
<211> 17	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A3-273T
<400> 10	
TGGCCCCCTGG TACCGT	17
<210> 11	<213> Artificial Sequence
<211> 17	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A4-8C
<400> 11	
TCCYGYWCAGA CSCCCCC	17
<210> 12	<213> Artificial Sequence
<211> 18	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A4-254G
<400> 12	
CTCAGGGTGA GGGGCTTG	18
<210> 13	<213> Artificial Sequence
<211> 17	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A1-67A
<400> 13	
GGCCCTGACC CAGACCA	17

<210> 14	<213> Artificial Sequence
<211> 17	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A1-67I
<400> 14	
GGCCCTGACC CAGACCT	
<210> 15	<213> Artificial Sequence
<211> 18	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A2-87G
<400> 15	
CAGTGGGCTA CGTGGACG	
<210> 16	<213> Artificial Sequence
<211> 18	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A2-87A
<400> 16	
CAGTGGGCTA CGTGGACG	
<210> 17	<213> Artificial Sequence
<211> 19	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A2-226A
<400> 17	
ACTCACAGAC TGACCGAGA	
<210> 18	<213> Artificial Sequence
<211> 19	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A2-226C
<400> 18	
ACTCACAGAC TGACCGAGC	
<210> 19	<213> Artificial Sequence
<211> 19	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A2-197A
<400> 19	
CTGTGASTGG GCCTTCACA	
<210> 20	<213> Artificial Sequence
<211> 19	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A2-197T
<400> 20	
CTGTGASTGG GCCTTCACT	
<210> 21	<213> Artificial Sequence
<211> 19	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A3-25A
<400> 21	
ACACOGTCCA GAGGATGTA	
<210> 22	<211> 19

<212> DNA	<220>
<213> Artificial Sequence	<223> PCR primer A3-25G
<400> 22	
ACACAGTCCA GAGGATGTG	19
<210> 23	<213> Artificial Sequence
<211> 18	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A3-68G
<400> 23	
TGTTAAGCT CCTGCTGG	18
<210> 24	<213> Artificial Sequence
<211> 19	<220><223> PCR primer A3-159A
<212> DNA	
<400> 24	
ATGGCGGCTC AGATCACCA	19
<210> 25	<213> Artificial Sequence
<211> 18	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A3-159C
<400> 25	
TGGCGGCTCA GATCACCC	18
<210> 26	<213> Artificial Sequence
<211> 19	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A4-224G
<400> 26	
ATGCTGCACA TGGCAGGTG	19
<210> 27	<213> Artificial Sequence
<211> 19	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A4-224T
<400> 27	
ATGCTGCACA TGGCAGGTT	19
<210> 28	<213> Artificial Sequence
<211> 21	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A2-29A
<400> 28	
TCCATGAGGT ATTTCTACAC A	21
<210> 29	<213> Artificial Sequence
<211> 21	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A2-29T
<400> 29	
TCCATGAGGT ATTTCTACAC T	21
<210> 30	<213> Artificial Sequence
<211> 17	<220>
<212> DNA	<223> PCR primer A2-229C

<400> 30
GAGCGCGATC CGCAGGC

<210> 31
<211> 17
<212> DNA

<400> 31
TCTCTCGCGG GTACCAAG

<210> 32
<211> 18
<212> DNA

<400> 32
CTTCCCGTC TCCAGGTG

【図面の簡単な説明】
 【図1】既知のHLA-A対立遺伝子型(HLA-Aアリルの第2エクソン)のDNA断片サイズ(RFLPバンドパターン)を記載した判定表を示す図である。
 【図2】既知のHLA-A対立遺伝子型(HLA-Aアリルの第3エクソン)のDNA断片サイズ(RFLPバンドパターン)を記載した判定表を示す図である。
 【図3】既知のHLA-A対立遺伝子型(HLA-Aアリルの第3、4エクソン)のDNA断片サイズ(RFLPバンドパターン)を記載した判定表を示す図である。
 【図4】少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子の塩基配列に特異的なプライマー対、または特定のHLA-A対立遺伝子群からなる少なくとも1つの特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的な各グループに対するプライマー対、およびそのPCR増幅産物のDNA断片サイズ記載した表を示す図である。
 【図5】表1に示したアリルグループ特異的プライマーを用いたPCR法によりHLA-A遺伝子の第2エクソン領域の増幅を行った結果を示す。
 【図6】表1に示したアリルグループ特異的プライマーを用いたPCR法によりHLA-A遺伝子の第3エクソン領域の増幅を行った結果を示す。なお、試料ナンバーは図5に記載のものと同じである。

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer A3-716

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer A3-240G

17
17
17
18

【図7】第2および第3エクソンに対するPCR増幅産物をそれぞれのグループに特異的な制限酵素を用いて切断した結果のRFLPパターンを示す(試料2)。
 【図8】第2および第3エクソンに対するPCR増幅産物をそれぞれのグループに特異的な制限酵素を用いて切断した結果のRFLPパターンを示す(試料6)。
 【図9】第2および第3エクソンに対するPCR増幅産物をそれぞれのグループに特異的な制限酵素を用いて切断した結果のRFLPパターンを示す(試料3)。
 【図10】第2および第3エクソンに対するPCR増幅産物をそれぞれのグループに特異的な制限酵素を用いて切断した結果のRFLPパターンを示す(試料8)。
 【図11】試料11および12に対し、表1に示したアリルグループあるいはシーケンス特異的のプライマーを用いたPCR法により、HLA-A対立遺伝子のA3301塩基配列特異的増幅、第2および第3エクソン領域の増幅を行った結果を示す。
 【図12】第2および第3エクソンに対するPCR増幅産物をそれぞれのグループに特異的な制限酵素を用いて切断した結果のRFLPパターンを示す(試料11)。
 【図13】第2および第3エクソンに対するPCR増幅産物をそれぞれのグループに特異的な制限酵素を用いて切断した結果のRFLPパターンを示す(試料12)。

【図11】



【図1】

HLA-Aアリの第2エキソンにおけるRFLPパターン

A2.1 group (265bp) 2901-2902-2903	Standard digestion ^a						Supplementary digestion ^a					
	Fok I	Hinf I	Hinf I	Msp I	Sac II	BstNI	Nla III	Nla IV	Apa II	Bpu I	Mnl I	
4301	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
2697	A	A	A	A	A	A	A	B	B	A	A	
6603	A	A	A	B	A	A	A	A	C	A	A	
6803	A	A	A	B	A	A	A	A	C	A	B	
2604-2602-2604 =2605-2608	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	
2609-2606 1101=1103=1104	A	A	B	B	A	A	A	A	C	A	A	
1102	A	B	A	A	A	B	A	C	C	A	A	
3401=3402=6601=6601 =6602=6601=6601	A	B	A	B	A	A	A	A	C	A	A	
68012	A	B	A	B	A	A	A	A	C	A	B	
6802	A	B	A	B	A	B	A	B	C	A	A	
0101=5601	B	A	A	A	A	D	A	A	A	A	C	
0102	B	A	A	B	B	A	C	A	B	C	C	
2404	C	A	A	A	A	A	A	B	B	A	D	
7401=7402	C	A	A	A	A	B	A	A	C	A	B	
7403	C	A	A	A	A	B	A	A	C	C	B	
3003	C	A	A	B	B	A	C	A	B	B	B	
3901=3033	C	A	A	B	A	A	A	A	C	A	B	
3103	C	A	A	C	A	B	A	D	C	A	E	
3902=2004	C	A	A	C	B	D	A	E	A	B	E	
8001	C	A	C	A	A	A	A	B	B	E	D	
2901=2902=2903 =0302=0302=DENV	C	B	A	A	A	A	A	A	A	A	B	
3001	C	B	A	A	B	A	A	C	A	B	B	

^a Fragment size (bp).
(Fok I) A: 264-326, C: 264-126 (Msp I); B: 262, D: 218+44; (Hinf I) A: 262, B: 227+35, C: 99+45; (Hinf II)
=265-121+21, (Bpu I) A: 264-121, B: 153+109; (Bst NI) A: 63-91+109, B: 153+109; (Bst NI) D: 243+19, E: 195+48+19, (Mnl I)
A: 36-236, B: 26-21-215, (Bpu II) A: 14+3+91+13, B: 14+3+91+13, C: 14+3+91+13, D: 14+3+91+13, E: 14+3+91+13, (Apa II) A: 159-56+15, C:
191-48+15, (Bpu III) A: 39+23+65+9+83+20, B: 150+56+93+20, C: 59+23+65+9+83, D: 83+66+9+83+20, E: 89+91+9+83+70;
(Mnl I) A: 18+32+21+34+96, B: 18+14+34+96, C: 18+14+34+96, D: 18+14+34+21+75, E: 18+14+34+21+75;

= indicates indistinguishable combination.

A2.2 group (265bp) HLA-A allele	Standard digestion ^a			A2.3 group (265bp) HLA-A allele	Standard digestion ^a			Supplementary digestion ^a		
	Fok I	Hinf I	Msp I		Bst NI	Bst NI	Mnl I	Apa II		
0201=0203=0204=0207	A	A	A	2301=2402=2403=2405 =2405=2410=2413=2414	A	A	A	A		
=0209-0212=0213 =0215=0216=0217 =0218-0219=0220				2403	A	A	B	A		
0202	A	A	B	3201=3202	A	B	B	B		
0211	A	B	A	3407	B	A	A	A		
0206=0210=0221	B	A	A	2502	B	A	B	B		
0205=0208=0214	B	A	B							

^a Fragment size (bp).
(Fok I) A: 203, B: 152+95; (Bst NI) A: 202, B: 129+73 (Msp I)
=66-34+21+81, B: 66+34+103 (Apa II) A: 203, B: 125+77

= indicates indistinguishable combination.

= indicates indistinguishable combination.

【図2】

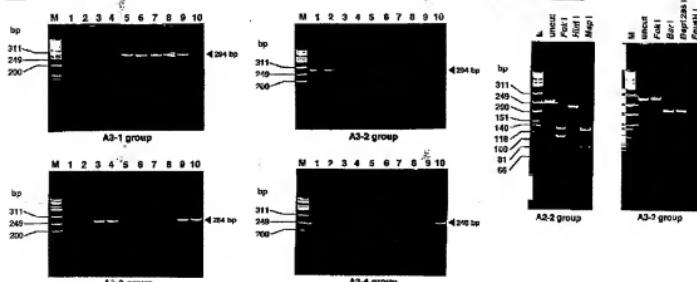
HLA-Aアリルの第3エキソンにおけるRFLPパターン

HLA-A allele	Standard digestion*				Supplementary digestion*					
	Pst I	Msp I	Mnl I	Hae III	Hpa I	Nla III	Bsu31 I	Pme I	Msp I (II)	Xba I
6802(1,2)=6803	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2902	A	A	A	A	B	A	A	A	B	A
2903	A	A	A	A	B	A	A	A	B	B
2901	A	A	A	A	B	A	B	A	B	A
8001	A	A	A	A	B	A	C	B	B	C
3402	A	A	B	A	A	B	A	A	B	A
3601	A	B	A	B	A	A	A	B	B	A
0101=0102	A	C	A	C	A	A	C	B	B	C
1101=1102	A	C	C	D	A	A	A	C	A	B
1104	A	C	A	E	A	A	A	A	B	A
1105	A	C	C	D	A	D	A	C	A	B
3202	A	D	D	E	A	A	C	A	B	A
3201=7401=7402=7403	A	D	D	E	A	B	C	A	A	B
3101=2301=3303	A	E	B	A	A	B	A	B	A	A
3004	A	E	A	A	B	A	B	A	A	A
3001=3002=3003	A	E	A	A	B	B	A	A	B	A
6802	B	D	E	E	B	A	B	A	A	A
2604	B	D	F	D	A	A	B	C	A	D
3401	B	D	F	E	A	A	B	A	A	A
6602=6603	B	D	F	E	A	A	B	C	A	D
2501=2502=2601 2603	B	F	D	A	A	B	C	A	A	D
=2605=2607 4501=6601										
2608	B	F	F	D	A	A	B	C	A	B
2606	B	F	I	D	A	A	B	C	C	A
2602	B	F	F	D	C	A	B	C	A	D
0301	C	A	G	A	A	A	A	A	B	D
1102	C	A	H	A	A	A	A	A	B	D
0303N	D	G	I	F	D	C	D	D	D	E

* Fragment size (bp):
 (Pst I) A: 294; B: 37+257; C: 227+467; (Msp I) A: 73+211; B: 47+264+467+74; C: 47+264+467+74; D: 224; E:
 47+264+467+74; F: 67+211; (Mnl I) A: 71+37+264+74; B: 71+37+264+74; C: 71+37+60+12+21+87; D: 68+137+60+39+487; E:
 14+57+74+21+87; F: 24+57+54+21; (Hae III) A: 71+37+264+74+12+11; B: 71+37+264+74+12+11; C: 71+37+264+74+12+11; D: 71+37+264+74+12+11; E: 65+74+60+21+14; (Hpa I) A:
 24+80+109+3; B: 24+80+109+3; C: 24+80+109+3; D: 24+80+109+3; E: 24+80+109+3; F: 24+80+109+3; (Nla III) A: 83+109+3; B: 83+109+3; C: 83+109+3; D: 83+109+3; E: 83+109+3; F: 83+109+3; (Bsu31 I) A: 146+40+106; B: 146+40+106; C: 146+40+106; (Pme I) A: 81+21; B: 294; C:
 89+165+21; D: 27+42+20; E: 294; F: 83+165+29; (Hpa II) A: 146+40+106; B: 146+40+106; C: 146+40+106; D: 146+40+106; E: 146+40+106; F: 146+40+106; (Xba I) A: 66+71+137; B: 66+71+137; C:
 55+26+21; D: 75+213; (Pme II) A: 232+72; B: 40+182+2; C: 294; D: 218+77; (Msp I (II)) A: 66+71+137; B: 66+71+137; C:
 66+106+157; D: 66+71+157; (Taq I) A: 203+91; B: 294; C: 288; (Bpu1286 I) A: 231+16+51; C: 237+57; D: 294; E: 285
 = indicates indistinguishable combination

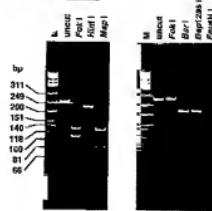
【図6】

Exon 3



【図7】

HLA3204 (IMM-9012)



【図3】

HLA-A- Δ アリルの第3エキソンにおけるRFLPパターン

A3-2 group (284bp) HLA-A allele	Standard digestion ^a			Supplementary digestion ^b	
	Pst I	Bsu I	Bsp1286 I/Fnu411	Msp I	Nla III
0201(=0206-0207-0209 =0211-0215N-0220 =0221-0901)	A	A	A	A	A
0208	A	A	A	A	B
0203	A	A	A	B	B
0212	A	A	A	C	A
0213	A	A	A	C	A
0219	A	A	B	C	A
0216	A	A	C	A	A
0210	A	B	A	A	A
0204	B	A	A	D	A

^a Fragment size (bp):
 (Pst I) A: 37+237, B: 294, (Bsu I) A: 56+29+218, B: 74+218; (Bsp1286 I) A: 221+73,
 B: 221+16+57, C: 294; (Fnu411) A: 34+104+21+20+53+22, B: 34+104+21+20+53+22, (Msp I) A:
 34+104+21+119+3+22, C: 34+104+12+39+17+72+3+22, (Nla III) A:
 14+37+57+69+59+47, B: 14+57+37+72+2+147, C: 14+57+37+69+12+27+87, D:
 14+57+69+39+47, (Msp III) A: 149+42+101, B: 158+195

= indicates indistinguishable combination.

A3-2 group (284bp) HLA-A allele	Standard digestion ^a			Supplementary digestion ^b	
	Bsp1286 I/Fnu411	Msp I	Nla III	Bsu I	Tsp I
2410	A	A	A	A	A
2403	D	A	A	A	A
0217	H	B	A	B	A
2413	C	B	A	A	A
2406	C	B	A	A	B
2414	C	B	A	B	A
2301	C	B	B	A	A
2402-2404-2405 =2407-2408	C	A	A	A	A

^a Fragment size (bp):
 (Bsp1286 I) A: 294, B: 21+37, C: 211+16+57; (Fnu411) A:
 24+104+12+30+173+12+21, B: 24+104+12+30+49+5+22, (Msp III) A:
 138+60+105, B: 138+146; (Bsu I) A: 66+218, B: 46+29+218, (Tsp I) A: 284,
 D: 151+93

= indicates indistinguishable combination.

HLA-A- Δ アリルの第4エキソンにおけるRFLPパターン

A4-1 group (280bp) HLA-A allele	Standard digestion ^a	
	BstNI	Pst I
330I	A	A
1a3=1-1=23-24-30=36	B	A
0203	C	B
Other	C	A

^a Fragment size (bp):
 (BstNI) A: 17+93+28+23+119, B: 76+32+28+23+119, C: 119+28+23+119,
 (Pst I) A: 17+110, B: 280

= indicates indistinguishable combination.

A3-4 group (248bp) HLA-A allele	Standard digestion ^a	
	Tsp I	
0214	A	
0202-0203-0208	B	

^a Fragment size (bp):
 (Tsp I) A: 268, B: 157+91
 = indicates indistinguishable combination.

【図4】

Primers used for group-specific amplification of HLA-A allele

Exon	Group	Specificity	Sense primer	Antisense primer	Concentration of primer (μM)	Size of PCR product (bp)	Temperature of annealing ($^{\circ}\text{C}$)
2	A2-1	A1, 3, 11, 24, 26, 29, 30, 31, 33, 34, 36, 43, 66, 68, 69, 74, 80	A2-5C	A2-234C	0.2	262	67
	A2-2	A2	A2-5T	A2-234C	0.2	263	62
	A2-3	A23, A24 (except 2404), 23, 32	A2-8IC	A2-238A	2	202	67
3	A3-1	A1, 3, 11, 25, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 43, 66, 68, 74, 80	A3-12A	A3-273T	0.2	294	67
	A3-2	A3 (except 0202, 0205, 0208, 0214, 0217), 69	A3-12G	A3-273T	0.2	294	67
	A3-3	A*0217, 23, 24	A3-25T	A3-273T	0.2	284	62
	A3-4	A*0202, 0205, 0208, 0214	A3-59G	A3-273T	0.2	248	62
	4	All HLA-A alleles	A4-8C	A4-234G	0.2	280	62

Primers used for PCR-SSP analysis

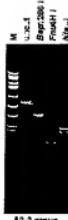
Distinguishable allele	Specificity	Sense primer	Antisense primer	Concentration of primer (μM)	Size of PCR product (bp)	Temperature of annealing ($^{\circ}\text{C}$)
A*0201=0207	0201	A3-25A	A3-273T	0.4	283	62
	0207	A3-25G	A3-273T	0.2	283	62
A*0201=0230	0201, 0203	A2-5T	A2-197T	0.2	228	62
	A*0205=0208	0208, 0220	A2-5T	A2-197A	0.2	228
A*0206=0221	0206	A2-8IG	A2-234C	0.2	181	62
	0221	A2-8TA	A2-234C	0.2	181	62
A*0207=0215N	0207	A4-8C	A4-224G	0.2	251	62
	0215N	A4-8C	A4-224T	0.2	251	62
A*2402=2405	2402	A3-159A	A3-273T	0.2	149	67
	2405	A3-159C	A3-273T	0.2	148	67
A*2601=2605	2601	A2-226C	A3-68G	0.2	415	62
	2605	A2-226A	A3-68G	0.2	415	62
A*3301=3303	3301	A3-71G	A3-740G	0.2	204	62
	A*7401=7402	A1-67A	A2-234C	0.2	403	67
	7402	A1-67T	A2-234C	0.2	403	67

Primers used for discrimination of heterozygous combinations

Combination of heterozygote	Specificity	Sense primer	Antisense primer	Concentration of primer (μM)	Size of PCR product (bp)	Temperature of annealing ($^{\circ}\text{C}$)
A*0201/0208=0205/0220	0220	A2-19A	A2-197A	0.4	207	59
A*0201/0205=0202/0206	0201, 0202	A2-29A	A2-197I	0.4	207	59
A*2402/2502=2407/2501	2501, 2502	A2-8IC	A2-239C	0.2	191	62
A*6602/6803=6603/68012	68012	A2-29T	A2-234C	0.2	242	59

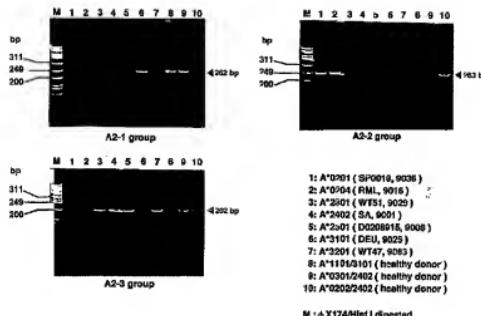
【図9】

S.A*2901 (WT51, 0229)

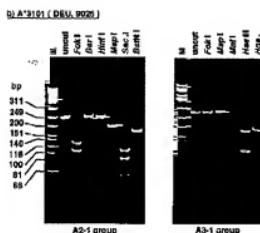


【図5】

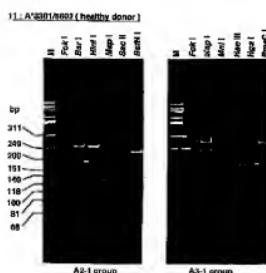
Exon 2



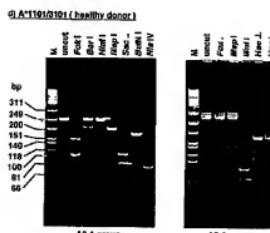
【図8】



【図12】



【図10】



【図13】

